

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002-529549

(P2002-529549A)

(43)公表日 平成14年9月10日(2002.9.10)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テ-マコ-ト* (参考)

C 0 8 B 15/04

C 0 8 B 15/04

4 C 0 9 0

37/00

37/00

G

37/04

37/04

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 27 頁)

(21)出願番号 特願2000-581063(P2000-581063)
(86) (22)出願日 平成11年11月9日(1999.11.9)
(85)翻訳文提出日 平成13年5月10日(2001.5.10)
(86)国際出願番号 P C T / E P 9 9 / 0 8 4 8 0
(87)国際公開番号 W O 0 0 / 2 7 8 8 6
(87)国際公開日 平成12年5月18日(2000.5.18)
(31)優先権主張番号 M I 9 8 A 0 0 2 4 4 3
(32)優先日 平成10年11月11日(1998.11.11)
(33)優先権主張国 イタリア (I T)

(71)出願人 アクイジティオ ソチエタ ペル アツィ
オニ
イタリア国, イ-20144 ミラノ, ピアッ
ツァーレ アクイレイア 8
(72)発明者 パルプッチ, ローランド
イタリア国, イ-20144 ミラノ, ピアッ
ツァーレ アクイレイア 8
(72)発明者 スポルトレッティ, ジャンカルロ
イタリア国, イ-20144 ミラノ, ピアッ
ツァーレ アクイレイア 8
(74)代理人 弁理士 石田 敬 (外4名)
Fターム(参考) 4C090 AA02 BA29 BA67 BA72 CA35
DA22 DA26

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 カルボキシル化多糖の架橋方法

(57)【要約】

本発明は、カルボキシル基を有する多糖の架橋体の調製方法に関する。この方法により、架橋度の完全な制御、並びに最終産物の不変な特徴に関する高い再現性が可能となる。本方法は、まず無水非プロトン性溶媒中でのカルボキシル基の活性化と、次にポリアミンとの反応とを含んで成る。得られた架橋多糖のヒドロキシ基を硫酸化してもよい。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 架橋された、カルボキシル基を有する多糖の調製方法であって、

- a) 無水の非プロトン性溶媒中での適当なカルボキシ活性化剤との反応による、前記多糖のカルボキシル基の活性化；
- b) カルボキシル基が活性化された前記多糖の、ポリアミンとの反応、を含んで成る前記方法。

【請求項2】 前記多糖が、ヒアルロン酸（組織又は細菌から得られる）、カルボキシメチルデキストラン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルスターチ、アルギン酸、セルロース酸、N-カルボキシメチル又はブチルグルカン又はキトサン、場合により脱硫酸化及びスクシニル化された種々の分子量のヘパリン、デルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ポリアクリル酸の中から選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 前記のカルボキシ活性化剤が、カルボニルジイミダゾール、カルボニルトリアゾール、ヨウ化クロロメチルピリジリウム（CMP-J）、ヒドロキシベンゾトリアゾール、p-ニトロフェノールp-ニトロフェニルトリフルオロアセテート、N-ヒドロキシスクシンイミドの中から選択される、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】 前記ポリアミンが一般式 $R_1-NH-A-NH-R_2$ を有する、請求項1～3のいずれかに記載の方法：ただし前記式中 R_1 及び R_2 は、同一であっても異なってもよく、水素、 C_1-C_6 アルキル、フェニル又はベンジル基であり、Aは、場合によりヒドロキシ、カルボキシ、ハロゲン、アルコキシ、アミノ基により置換される C_2-C_{10} アルキレン鎖、好ましくは C_2-C_6 アルキレン鎖；式 $[(CH_2)_n-O-(CH_2)_m]$ のポリオキシアルキレン鎖、ただし n は2又は3であり、 m は2～10の整数であり； C_5-C_7 シクロアルキル基；アリール、又はヘタリール基、好ましくは1, 3又は1, 4-二置換ベンゼンである。

【請求項5】 前記多糖が親脂性カチオンにより塩化される、請求項1～4のいずれかに記載の方法。

【請求項6】 前記親脂性カチオンがトリブチル又はテトラアルキルアンモニウムである、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 前記の架橋反応を無水ジメチルホルムアミド又はテトラヒドロフラン中で行う、請求項1～6のいずれかに記載の方法。

【請求項8】 更に、得られた架橋された多糖に対して、ピリジン／三酸化イオウ錯体との反応により、そのヒドロキシ基の硫酸化を行う、請求項1～7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】 前記の硫酸化反応をジメチルホルムアミド中で不均質相で0～10℃で約0.5～約6時間行う、請求項8に記載の方法。

【請求項10】 更に、場合により硫酸化された、架橋された多糖に対して、銅、亜鉛又は鉄イオンの水性溶液により錯体化反応を行う、請求項1～9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】 請求項1～10の方法により得られる架橋された多糖。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

本発明は、カルボキシル化された多糖の架橋方法に関する。

本発明の方法は、得られた産物における架橋度に関する高い再現性、架橋鎖分布の均質性、当該産物の化学物理学的な特徴、並びにそれらから得られる製品の技術的な特徴を提供する。

【0002】

前記の再現性は、医療、医薬及び皮膚化粧の分野において特に重要である。

本発明は更に、前記方法により得られる生産物、並びに医療、医薬及び皮膚化粧の分野におけるそれらの適用にも関する。

【0003】**発明の背景**

医療／医薬分野における、更に最近では皮膚科学的化粧の分野における高分子の利用が十分に確立している。高分子は、医薬品の製造において増粘剤、滑沢剤、胃耐性被膜剤として、そして特にカプセル、ゲル、コロイドの製造、及び種々のデバイス（例えばコンタクトレンズ、ガーゼなど）の製造において使用されている。また活性成分の放出調節性薬剤の製造においても高分子が使用されている。

【0004】

それらの特性及び医薬品への使用に関する論説が下記文献に記載されている。

1) C.Hansch et al. Editors, "Comprehensive Medicinal Chemistry" Pergamon Press, Oxford, 1990, vol.1-6;

2) A.Wade and P.J.Wellers, Editors, "Handbook of Pharmaceutical Excipients", Ed. 1994, The Pharmaceutical Press.

【0005】

この様な高分子は種々の化学薬品群に属し、そして合成物、天然物又は半合成物である。

合成高分子の例は、ポリビニルピロリドン、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリビニルアルコール、ポリメタクリレートを含む。天然高分子の例は、

天然ヒアルロン酸（HY）及びセルロースを含む。

半合成高分子の例は、食品産業及び医療産業において広く用いられているカルボキシアシルセルロースを含む。これらの高分子は、直鎖状、又はわずかに分枝状の構造であるという特徴を有する。

【0006】

化学的、酵素的及び機械的な強さを増加させるために非常に重要な修飾は、合成ポリマー及び天然（既にいくらかは修飾されている）ポリマーの両者に対して行い得る架橋により提供される。

架橋されたポリマーの例は、胃における錠剤又はカプセル剤の保護のために用いられるポリマー（ポリメタクリレート）、そして乳化剤、懸濁化剤、錠剤硬化剤（カルボポール）として用いられるポリマー、そして以下で説明する架橋ヒアルロン酸を含む。

【0007】

考慮される適用のために、そして特に、非経口的に適用される必要のある侵襲性医療デバイスの製造のために、前記ポリマーはいくつかの技術上及び規制上の必要条件を満たす必要がある。

技術上の必要条件には下記のものが含まれる。

- 1) 高い生体適合性。
- 2) 酵素系、組織又は血漿内酵素系（注射用製剤の場合）及び胃腸管内酵素系（経口製剤の場合）の両者に対する耐性。

徐々な崩壊が、例えば薬剤の調節放出のために、求められることがある。

【0008】

前記高分子が、長期間継続する必要がある組成物／製品中に、例えば滑液代用品中に、種々の手術において組織接着防止剤としてのフィルム、スポンジ又はゲル中に、組織工学物（人工臓器）中に、火傷治療及び一般的には美容手術に用いられる人工皮膚中に存在する場合、前記の耐性は特に重要である。

- 3) 種々の形（ゲル、フィルム、スポンジなど）への成形可能性。
- 4) 産物の構造を変えずに、化学的又は物理的に滅菌される可能性。

【0009】

規制上の要件によれば、種々の製造バッチの組成物が、非常に狭い制約内で一定に維持される必要がある。このことは、製造方法が標準化されていること、そして基材成分の本質的な変異性が非常に低いことを意味する。

高分子の不均質性の考えられる原因は、分子量の分散に由来する。この様な不均質性は、架橋の結果、なおより高くなる。このことは、最終産物の使用分野及び適用目的に応じて重大な欠点となり得る。

【0010】

EP-A-566118 (Kimberly-Clark) は、おむつ及びその類似品のための表面吸収体として用いられる架橋多糖を開示している。

そこに記載されている方法は、ポリアミン、ポリオール又はそれらの混合物と、多糖のカルボキシル基との間の分子間アミド、エステル又はエーテルの形成によるセルロースの架橋に基づくものである。

この反応は、多糖とポリオール及び／又はポリアミンとの混合物を約80℃で加熱することにより行われる。この方法は確かに経済的であり、再現性要件がそれほど厳しくない場合には大規模生産に適する。

【0011】

US 5465055は、多糖のCOOHと、他の分子のOH基とのエステル化により、架橋アームの挿入なしに得られた架橋多糖（ヒアルロン酸及びアルギン酸）を開示している。

WO 91/9119は、バリウムイオンと共に架橋されたアルギン酸から成る、バイオハイブリッド臓器としてのランゲルハンス島用マイクロカプセルを開示している。

EP 190215は、種々のポリマー（カルボキシル化スターチ、デキストラン、セルロース）の、二官能価又は多官能価エポキシドによる架橋を開示している。

【0012】

ヒアルロン酸のための下記架橋剤が報告されている。

US 4716224, 4772419, 4716154に、多官能価エポキシドが開示されている；

US 4957744に、ポリアルコールが開示されている；

US 4605691, 4636524に、ジビニルスルホンが開示されている；

US 4713448, 4582865に、アルデヒドが開示されている；

US 5356833に、カルボキシアミドが開示されている；

EP-A-718312に、ポリカルボン酸が開示されている。

【0013】

発明の開示

本発明は、カルボキシル基を含んでいる多糖の架橋物の調製方法であって、架橋度の完全な制御、並びに最終産物の一定の特性に関する高い再現性を可能にする前記方法に関する。

【0014】

本発明の方法は、

- a) 無水非プロトン性溶媒中での適当なカルボキシ活性化剤との反応による、多糖のカルボキシル基の活性化；
- b) そのカルボキシル基が活性化された多糖とポリアミンとの反応、
を含んで成る。

【0015】

得られた架橋多糖に対して、所望により、その遊離ヒドロキシ基の硫酸化又はヘミスクシニル化を行ってよい。

本発明の方法により得られる産物を、金属イオン、例えば亜鉛、銅又は鉄イオンと共に錯体化してもよい。

【0016】

本発明において用い得るカルボキシ含有多糖は、天然物、合成物又は半合成物であってよい。この多糖の例は、ヒアルロン酸（組織又は細菌由来）、カルボキシメチルデキストラン、カルボキシメチルセルロース、カルボキシメチルスターチ、アルギン酸、セルロース酸、N-カルボキシーメチル又はブチルーグルカン又はキトサン、場合により脱硫酸化及びスクシニル化された種々分子量のヘパリン、デルマタン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ポリアクリル酸を含

む。

【0017】

特にヒアルロン酸、カルボキシメチルセルロース、ヘパリン、アルギン酸及びポリアクリル酸が好ましい。

前記の架橋されたポリマーは、種々の方法で得られ、既知であり、そしていくつかの使用法が提唱されている（例えばEP 566118, WO 91/9119, US 5465055, EP 190215, EP 718312, US 4716224参照）。

【0018】

前記のカルボキシ活性化剤は、通常、ペプチド化学で用いられるものである。適当な活性化剤の例は、カルボニルジイミダゾール、カルボニルトリアゾール、ヨウ化クロロメチルピリジリウム（CMP-J）、ヒドロキシベンゾトリアゾール、p-ニトロフェノールp-ニトロフェニルトリフルオロアセテート、N-ヒドロキシスクシンイミド及び類似物を含む。特にヨウ化クロロメチルピリジリウムの使用が好ましい。

【0019】

前記ポリアミンは、好ましくは一般式 $R_1-NH-A-NH-R_2$ を有するものであり、ただし前記式中、

R_1 及び R_2 は、同一でも異なってもよく、水素、 C_1-C_6 アルキル、フェニル又はベンジル基であり、

Aは、場合によりヒドロキシ、カルボキシ、ハロゲン、アルコキシ、アミノ基により置換された C_2-C_{10} アルキレン鎖、好ましくは C_2-C_6 アルキレン鎖；式 $[(CH_2)_n-O-(CH_2)_m]$ のポリオキシアリキレン鎖、ただしnは2又は3であり、mは2~10の整数である；アリール又はヘタリール基、好ましくは1,3-又は1,4-二置換ベンゼンである。好ましくはAは、 C_2-C_6 直鎖状アルキレン又は式 $[(CH_2)_n-O-(CH_2)_m]$ の鎖である。

【0020】

架橋反応を、好ましくは、テトラヒドロフラン、ジメチルホルムアミド又はジメチルスルホキシドから選択される溶媒中で行う。前記多糖は、好ましくは、親

脂性カチオン、例えばテトラアルキルアンモニウム又はその他の親脂性有機塩基により塩化される。

【0021】

無機塩、例えばナトリウム塩の、適当な有機親脂性塩への変換を、均質相中で既知のイオン交換法により、あるいは酸成分の沈殿、次にその回収、そして所望の有機塩基による塩化により行い得る。

【0022】

カルボキシル基の活性化反応を、均質相中で且つ無水極性非プロトン性溶媒中で行う。

前記無水溶媒中に希釈されたポリアミンを、前記の活性化されたエステルの溶液に加え、0～30℃の温度に保つ。架橋反応の時間は1～12時間であり、また、適当な塩基性物質（例えばトリエチルアミン）の任意の存在にも依存する。

【0023】

一般的には、最終産物を、異なる溶媒を反応溶媒に添加して、当該有機塩を沈殿させることにより、あるいは溶媒の蒸発により回収し、次に遠心、蒸留水による洗浄、所望のアルカリ（例えばナトリウム、カリウム）溶液中への分散の繰り返し、次に水による洗浄、そして真空下又は凍結乾燥による当該アルカリ塩の最終乾燥を行う。

【0024】

活性化反応及び架橋反応は実質的に定量的であるので、架橋度（C. L. D）は広い制限内で変動し、そしてカルボキシ活性化剤の量を変えることによって調整され得る。

【0025】

本発明により得られた架橋多糖に対して、その中に存在する場合には、そのヒドロキシ基の硫酸化反応を、通常はジメチルホルムアミド中でのピリジン-三酸化イオウとの反応により、行い得る。

この反応を、不均質相中で、0～10℃の温度で、約0.5～約6時間の範囲で行う。

【0026】

得られた硫酸化の程度は、ヒドロキシ基の総量に応じて、広い制限内にあり、そして反応温度及び時間を変えることにより調整され得る。一般的には、硫酸化の程度（硫酸基の当量／gと定義される）は $1 \times 10^{-6} \sim 6 \times 10^{-6}$ であり、架橋度が0.5である場合、好ましくは 2×10^{-6} 当量／gである。

【0027】

本発明により得られた、場合により硫酸化された架橋ポリマーは、金属イオン、例えば亜鉛、銅又は鉄イオンと錯体化し得る。

この様な錯体を以下の通りにして得ることができ、すなわち、水中で産物が完全に膨潤するまで溶解又は分散し、そして攪拌しながら、好ましくは室温で、有機又は無機金属塩、例えば CuCl_2 、 ZnCl_2 、 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)$ の濃溶液を加え、12～24時間攪拌した後、遠心により、又は異なる溶媒（例えばエタノール又はアセトン）の添加後の沈殿又は真空下での蒸発により錯体を回収し、この回収された粗産物を、過剰なイオンを取り除くために、蒸留水で完全に洗浄することにより得ることができる。

【0028】

次に、この錯体を凍結乾燥する。金属イオンの含量は、用いた操作条件、特にポリマー対イオンのモル比、溶液の濃度及びpH、反応時間、及び特に架橋度に応じて変動する。

【0029】

本発明の方法では、架橋度及び／又は硫酸化度を適当に調整することにより、広範囲の形の架橋カルボキシル化多糖の調製が可能となる。それらの多糖は、種々の特性、例えば粘弾性、水和度、金属イオンとの錯体形成能、ヒドロゲル形成能、フィルム又はスポンジ形成能、最終物の機械強度により特徴付けられる。

【0030】

従って、多くの医療分野で、人間及び動物に関する分野で、そして皮膚化粧の分野で、それらの使用が可能となる。

下記実施例により本発明を説明する。

【0031】

実施例 1

1, 3-ジアミノプロパンにより100%架橋されたカルボキシメチルセルロースゲル。

二糖単位を基準にして 1.2×10^{-3} モルのカルボキシメチルセルロースTBA塩を、窒素ガス下で攪拌しながら、30mlのDMF中に溶解した。2mlのDMF中に溶解した0.32g (1.2×10^{-3} モル)のヨウ化クロロメチルピリジリウムを、氷で0℃に維持された、前記溶液に一滴ずつ加えた。

【0032】

カルボキシメチルセルロースは、その二糖単位あたり一官能価を有するので、このモル比は1:1であった。20分後に、前記溶液に、2mlの架橋性1, 3-ジアミノプロパン(0.006モル)を加え、その直後に0.5mlのトリエチルアミンを加えた。生成した固体のゼリー様産物をDMFで洗浄し、そしてH₂O中で完全に膨潤させた。

次にEtOH及びH₂Oによって交互に洗浄した。最後にEtOHによって洗浄した後、生産物を凍結乾燥した。

【0033】

I. R. (フィルム; cm⁻¹) : 1650 (-CO-NH-) ; 約1400での-COOの変角振動なし。

SD (膨潤度、室温で水中に15秒放置した後、重量測定する。SD = ((W_s - W_d) / W_d) × 100、ただしW_s = 水和したゲルの重量、W_d = 乾燥ゲルの重量) : 7000。

SEM (走査電子顕微鏡) : この構造体はコンパクトであり、15~35 μpersを有する様に見える。

ウサギPRP (富血小板血漿) への暴露から、この産物表面における血小板又は凝集体の存在は、低密度ポリプロピレンにより得られた等価産物 (ECにおける参照基準) に比べて非常に低いことが分かる。

【0034】

実施例2

1, 3-ジアミノプロパンにより50%架橋されたカルボキシメチルセルロースゲル。

二糖単位を基準にして 1.2×10^{-3} モルのカルボキシメチルセルロースを、窒素ガス下で攪拌しながら、30mlのDMF中に溶解した。2mlのDMF中に溶解した0.24g (1.2×10^{-3} モル)のヨウ化クロロメチルピリジリウムを、氷で0℃に維持された前記溶液に一滴ずつ加えた。このモル比は2:1であった。

【0035】

20分後に、前記溶液に、2mlの架橋性1,3-ジアミノプロパン (3×10^{-3} モル)を加え、その直後に更に0.5mlのトリエチルアミンを加えた。生成した固体のゼリー様産物をDMFで洗浄し、そしてH₂O中で完全に膨潤させた。

次にEtOH及びH₂Oによって交互に洗浄した。最後にEtOHによって洗浄した後、生産物を凍結乾燥した。

I. R. (フィルム; cm^{-1}) : 1650 (—CO—NH—) ; 約1400での —COO^- の変角振動なし。

SD : 8000。

SEM : 13~25 μpers の存在。

血小板接着 : 実施例1の記載通り。

【0036】

実施例3

1,3-ジアミノプロパンにより50% (二糖単位を基準にして100%) 架橋されたアルギン酸。

アルギン酸のTBA塩を、そのナトリウム塩から、H⁺形 (酸性形) の強カチオン性樹脂 (Dovex) 上のイオン交換、次に水酸化テトラブチルアンモニウム (TBA-OH) による中性化、最後に凍結乾燥により調製した。

単糖単位を基準にして 1.2×10^{-3} モルを、窒素ガス下で攪拌しながら、30mlのDMF中に溶解した。2mlのDMF中に溶解した0.36g (1.2×10^{-3} モル)のヨウ化クロロメチルピリジリウムを、氷で0℃に維持された前記溶液に一滴ずつ加えた。このモル比は1:1であった。

【0037】

20分後に、前記溶液に、 6×10^{-3} モルの架橋性1,3-ジアミノプロパン

(0.024モル)を加え、その直後に更に0.5mlのトリエチルアミンを加えた。生成した固体のゼリー様産物をDMFで洗浄し、そしてH₂O中で完全に膨潤させた。

次にEtOH及びH₂Oによって交互に洗浄した。最後にEtOHによって洗浄した後、生産物を凍結乾燥した。

IR (フィルム; cm⁻¹) : 1635 (ブロード) (—CO—NH—) ; 約1400 (—COO⁻)。

SD : 5000

SEM : この構造はコンパクトであり、そして孔はない。

【0038】

実施例4

C. L. D=0.05 (利用可能なカルボキシル基の5%)で架橋されたヒアルロン酸の調製。架橋剤：1, 3-プロパンジアミン。

下記の方法のいずれかにより、ヒアルロン酸のナトリウム塩(二糖単位を基準にして 1×10^{-3} モル)をTBA塩に変換した。

a) ヒアルロン酸ナトリウムの1%水溶液を、強H⁺ カチオン性樹脂(Amberlite IR 120)によりH⁺形に変換する。その最終溶液をTBA-OHの0.5%溶液により処理して、pH約9にする。

b) ヒアルロン酸ナトリウムの1%水溶液を、TBA⁺形の弱カチオン性樹脂(Amberlite IRC 50)で処理することにより、TBA塩溶液に変換する。

【0039】

いずれの場合も、最終溶液を凍結乾燥する。次にこのTBA塩を、窒素ガス下で0℃で、15mlの無水DMF中に溶解し、そのTBA塩の保存溶液に、2mlの無水DMF中の0.02gのヨウ化クロロメチルピリジリウム(CMPJ)を一滴ずつ加える。

次にこの反応混合液に、0.1mlのトリエチルアミンを加え、更に2mlの無水DMF中の1, 3-ジアミノプロパン溶液(d=0.88、活性化されたカルボキシル基の架橋をより容易にするために過剰量用いる)を一滴ずつ加えた。添加

終了後、この反応混合液を少くとも30分間攪拌し、それから減圧下でその溶媒を除き、その残査をDMFにより回収し、そのDMFを蒸留により除き、次にその残査を、エタノール、エタノール水、そして最後に水によって処理した。

【0040】

次にこの産物を凍結乾燥し、そして分析した。

IR (フィルム; cm^{-1}) : 1630 ($-\underline{\text{CO}}-\text{NH}$) ; 1740 ($-\underline{\text{COOH}}$ 、多糖) ; 3200 ($-\text{NH}-$)。

SD (膨潤度、室温で水中に15秒放置した後、重量測定する。SD = $((W_s - W_d) / W_d) \times 100$ 、ただし W_s = 水和したゲルの重量、 W_d = 乾燥ゲルの重量) : 31000。

架橋度 : 0.05 (最初に利用可能なカルボキシル基の5%)

【0041】

実施例5

C. L. D = 0.05 (利用可能なカルボキシル基の5%) で架橋されたヒアルロン酸の調製。架橋剤 : 1, 6-ジアミノヘキサン。活性化剤 : ヨウ化クロロメチルピリジリウム。

実施例4に記載した手順及び条件に従って、同一のヒアルロン酸(HY)及び同一の活性化剤を用いて、しかし1, 3-ジアミノプロパンの代りに1, 6-ジアミノヘキサンを用いて、架橋誘導体を得た。

IR (フィルム; cm^{-1}) : 1630 ($-\underline{\text{CO}}-\text{NH}$) ; 1740 ($-\underline{\text{COOH}}$ 、多糖) ; 3200 ($-\underline{\text{NH}}-$)。

【0042】

実施例6

C. L. D = 0.05 (利用可能なカルボキシル基の5%) で架橋されたヒアルロン酸の調製。架橋剤 : 0, 0'-ビス-(2-アミノプロピル)PEG500。活性化剤 : ヨウ化クロロメチルピリジリウム。

実施例4に記載の手順及び条件に従って、同一の活性化剤を用いて、しかし1, 3-ジアミノプロパンの代りに0, 0'-ビス-(2-アミノプロピル)PEG500を用いて、架橋誘導体を得た。

I R (フィルム; cm^{-1}) : 1630 ($-\underline{\text{CO}}-\text{NH}$) ; 1740 ($-\underline{\text{COOH}}$ 多糖) ; 3200 ($-\underline{\text{NH}}-$) 。

S D : 31000。

【0043】

実施例7

C. L. D. = 0.3 (利用可能なカルボキシル基の30%) で架橋されたヒアルロン酸の調製。架橋剤: 1, 3-プロパンジアミン。活性化剤: ヨウ化クロロメチルピリジリウム。

0.6 g のヒアルロン酸トリブチルアンモニウム塩 (二糖単位を基準にして 1×10^{-3} モル) を、窒素ガス下で攪拌しながら、30 ml の DMF 中に溶解した。2 ml の DMF 中に溶解した 0.08 g のヨウ化クロロメチルピリジリウム (3.5×10^{-4} モル) を、0°C に維持された攪拌中の前記溶液に一滴ずつ加えた。従ってこのモル比は約 3 : 1 であった。

【0044】

20 分後に、2 ml の 1, 3-ジアミノプロパン (0.024 モル) を加え、その直後に 0.5 ml のトリエチルアミンを加えた。固体のゼラチン状の産物が得られた。次にこの産物を水で膨潤させ、そして再度エタノールで洗浄した。

この最終産物は、凍結乾燥後に、走査顕微鏡観察から、滑らかな領域とスポンジ状の領域とが交互に存在する不規則なパターンを有することが分かった。

架橋度は 0.3 (最初に利用可能であったカルボキシル基の30%) であった。

I R (フィルム; cm^{-1}) : 1740 ($-\underline{\text{COOH}}$) ; 1630 ($-\underline{\text{CO}}-\text{NH}$) ; 1610 ($-\underline{\text{COO}}-$) ; 1560 ($-\text{CO}-\underline{\text{NH}}-$) 。

【0045】

実施例8

C. L. D. = 0.5 (利用可能なカルボキシル基の50%) で架橋されたヒアルロン酸の調製。架橋剤: 1, 3-プロパンジアミン。活性化剤: ヨウ化クロロメチルピリジリウム。

0.6 g のヒアルロン酸トリブチルアンモニウム塩 (HY TBA) (二糖単

位を基準にして 1×10^{-3} モル) を、窒素ガス下で攪拌しながら、30mlのDMF中に溶解した。2mlのDMF中に溶解した0.15gのヨウ化クロロメチルピリジリウム (CMPJ) (6×10^{-6} モル) を、0℃に保ちながら、前記溶液に一滴ずつ加えた。このモル比HYTBA: CMPJは2:1であった。20分後に、前記溶液に2mlの1, 3-ジアミノプロパン (0.024モル) を加え、その後0.5mlのトリエチルアミンを加えた。固体のゼリー様の産物が得られ、そしてこれをDMFで完全に洗浄した。

DMFを蒸発した後、この産物を水中で膨潤させ、エタノールで洗浄し、そして凍結乾燥した。

【0046】

得られた産物は、架橋度0.5を有し、そして走査顕微鏡では大きなメッシュが間に入り込んだ粒状の外観を示した。より高倍率では、この2つの形態は明らかに同一であり、直径数ミクロンの丸型の隆起物を示した。

IR (フィルム; cm^{-1}) : 1740 ($-\text{COOH}$) ; 1630 ($-\text{CO}-\text{NH}-$) ; 1610 ($-\text{COO}^-$) ; 1560 ($-\text{CO}-\text{NH}-$) 。

このゲルをPBS中で膨潤させ、そして最大膨潤能を評価した。SD = 23500。

【0047】

【化1】

NMR (13C; ppm) : 29.3及び39.8 ($-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ プロパンジアミン

連結) ; 172.5 ($-\overset{\cdot}{\underset{\text{O}}{\parallel}}{\text{C}}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$) 。

23 ± 0.1℃の温度で、Bohlin VORレオメーターで評価したレオロジー特性から、動的弾性率 G' (10Hzで100Pa) は、考慮した2つの濃度 (10及び20mg/ml) で同一であり、そして常に動的粘性率 G'' (20mgで10Hzで40Pa、及び10mgで10Hzで20Pa) よりも高いことが示された。

【0048】

実施例9～12

上記実施例に記載した方法に従って、表1に要約した特徴を有する架橋ヒアルロン酸誘導体を、 1×10^{-3} モル (0.6 g) のヒアルロン酸トリブチルアンモニウム塩から調製した。得られた誘導体は下記の特徴を有した。

【0049】

【表1】

表 1

実施例	架橋剤 (モル)	CMPJ量g (モル)	架橋度	SD	NMR (13) (ppm)	I. R. (71/μ) (cm ⁻¹)	走査電子顕微鏡 (SEM)
9	1,3-ブドウ糖 ジアミン (0.024)	0.6g (1.210 ⁻³)	(100%)	13200	29.3/39.8 (-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -ブドウ糖 アミン/連結); 172.5 (-C(=O)-NH-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -)	1630 (-CO-NH-); 1560 (-CO-NH-);	均質で、波状の 形態。
10	0,0'-1-ヒス- ス-(2-ジアミン アミン) PEG500 (0.022)	0.15g (6×10 ⁻⁴)	(50%)	9000			滑らかな領域と メッシュ状とが交互 にあり、サイズ数 ミクロンの円形隆起 がある。
11	0,0'-ヒス- (2-ジアミン) アミン-PEG 800 (0.022)	0.15g (6×10 ⁻⁴)	(50%)	6100			形態的に異なる 2つの領域があり、 1つは波状の ものであり、 もう1つは穴様 構造である。
12	1,6-ジアミン/ハ キサミン (0.023)	0.15g (6×10 ⁻⁴)	(50%)	8000	169.46 (架橋の-CO-NH-); 74.04/76.80/83.17/80.41 (架橋7-4の-CH ₂ -)	1740 (-COOH); 1630 (-CO-NH-); 1610 (-COO ⁻); 1560 (-CO-NH-);	滑らかな表面、 サイズ数ミクロンの隆 起部あり。

【0050】

実施例13

50%架橋されたヒアルロン酸の硫酸化。

実施例8で得られた誘導体を、窒素ガス下で強く攪拌しながら、5mlのDMF中に分散した。

1モルDMF中の1gの SO_3 / ピリジンの溶液を0℃で加え、3時間攪拌した。過剰の H_2O (50ml)を加えることにより、反応を阻害し、そしてそのpHを0.1M NaOHで9に調整した。

この産物をエタノール及び水で完全に洗浄し、そして凍結乾燥した。

【0051】

IRスペクトルでは、開始産物のバンドの他に、 1260cm^{-1} に1つのピークが、そして 1025cm^{-1} に1つのより強いバンドが示された。

PBS中での当該ゲルの膨潤では、 $\text{SD}=33000$ であった。より高分解な ^{13}C NMRスペクトルでは、37℃、水中で、表2に示した通りのシグナルが示された。29.3及び38.8ppm ($-\text{CH}_2-$)でのNMRシグナル強度及び172.5ppm (CONH)でのシグナル強度から、架橋度が約50%であることが確認された。

【0052】

このレオロジー特性は、動的弾性率 G' (10Hzにて20mgで2500Pa、そして10mgで1000Pa)により特徴づけられ、これは、常に動的粘性率 G'' (10Hzにて20mgで600Pa、そして10mgで150Pa)よりも高く、そして非硫酸化HYにおいて得られた対応する値(50%で13、実施例5)よりも非常に高い。この化合物のトロンビン時間(TT) ($61 \pm 5''$)は、コントロール($14.0''$)及び対応非架橋体($14.6''$)よりも長い。

ストレスを与えたウサギを用いたPRPテストでも、当化合物は活性を示した。

【0053】

【表2】

表 2

 ^{13}C 化学シフトの表

C-1	C-2	C-3	C-4	C-5	x-C=O	y-CH ₃	
103.5	57.3	85.4	71.3	78.7	178.0	25.3	ppm
C-1'	C-2'	C-3'	C-4'	C-5'	6-C=O		
105.9	75.2	76.4	82.8	78.6	176.2		ppm
1-CH ₂	2-CH ₂	3-CH ₂	6'-C=O	架橋			
39.8	29.3	39.8	172.5				ppm

【0054】

実施例 14

アルギン酸ゲルの硫酸化

当該架橋産物を、EtOH処理後に凍結乾燥することにより完全に除湿し、そしてそのアルコール基を硫酸化した。

5mlのDMF中に分散した架橋産物100mgを、 SO_3^- ピリジン溶液（800mg/2ml DMF）に加えた。この反応を、0℃、窒素ガス下で2時間一定に攪拌することにより行う必要がある。反応が抑制されるので、当産物が吸湿しないことが必須である。

2時間後 H_2O を加え、そして1M NaOH溶液によりそのpHを9に調整し、それによりピリジンを遊離させた。

次にこの硫酸化合物をEtOH中で精製した。

【0055】

精製した産物の分析を以下に示す。

IR（フィルム； cm^{-1} ）：1263（伸縮性のSO）。

SO_3^- 基の当量/gゲル（トルイジン錯体による）：

5%架橋ゲル	6×10^{-5}
50%架橋ゲル	2×10^{-5}
100%架橋ゲル	3×10^{-5}

SD：

5%架橋ゲル	1.9×10^3
50%架橋ゲル	9×10^{-3}
100%架橋ゲル	7×10^{-3}

【0056】

実施例15

同じ方法により、実施例10、11及び12に記載の50%架橋産物の硫酸化誘導体を合成した。

表3で、これらの硫酸化誘導体の熱量測定における特徴を、実施例8及び13に記載の産物の特徴と共に示す。

【0057】

【表3】

表 3

架橋ポリマー (50%架橋度)	ΔH_a [J/g]	T_g [°C]	ΔH_b [J/g]	Wt% 水
C. L. Hya I-1, 3 (実施例8)	276	51	42	12
C. L. Hya I S-1, 3 (実施例13)	357	64	53	16
C. L. Hya I-1, 6 (実施例12)	327	64	58	16
C. L. Hya I S-1, 6	465	64	65	20
5 C. L. Hya I-P500. 2NH ₂ (実施例10)	239	45	72	10
6 C. L. Hya I S-P500. 2NH ₂	384	69	113	16
7 C. L. Hya I-P800. 2NH ₂ (実施例11)	179	73	30	10
8 C. L. Hya I S-P800. 2NH ₂	206	76	52	10
Hya I TBA	164	—	130	5

 ΔH_a [J/g] : 水蒸気化エンタルピー T_g [°C] : ガラス転移温度 ΔH_b [J/g] : 熱崩壊過程におけるエンタルピーWt% 水 : ΔH_a に基づく水含有率%

【0058】

実施例 16

カルボキシメチルセルロースゲルの硫酸化。

実施例 14 に記載の手順及び条件に従って、前記硫酸化誘導体を得た。

SO₃ 基の当量 / g :a) 5% 架橋 CMC 8×10^{-6}

$$\text{b) } 50\% \text{架橋CMC} \quad 7 \times 10^{-6}$$

$$\text{c) } 100\% \text{架橋CMC} \quad 4 \times 10^{-6}$$

SD:

$$\text{a) } 20 \times 10^3$$

$$\text{b) } 12 \times 10^{-3}$$

$$\text{c) } 9 \times 10^{-3}$$

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 99/08480	
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C08B15/00 C08B37/04 C08B37/08	
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC	
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C08B	
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched	
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X	WO 98 08897 A (S.C.R.A.S.) 5 March 1998 (1998-03-05) see the whole document 1-7,11
Y	EP 0 265 116 A (FIDIA) 27 April 1988 (1988-04-27) page 9, line 36 - line 44 1-7,11
-/-	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.	
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 14 February 2000	Date of mailing of the international search report 23/02/2000
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2200 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 051 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3010	Authorized officer Lensen, H

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. No.
PCT/EP 99/08480

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 1997, no. 11, 28 November 1997 (1997-11-28) & JP 09 176204 A (KOBAYASHI KAZUKIYO ET AL.), 8 July 1997 (1997-07-08) abstract & DATABASE WPI Week 199737 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 399535 abstract</p>	1-7, 11

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

 Title and Application No
 PCT/EP 99/08480

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
NO 9808897 A	05-03-1998	FR 2752843 A	06-03-1998
		AU 4121597 A	19-03-1998
		EP 0922071 A	16-06-1999
		NO 990935 A	15-04-1999
		PL 331848 A	16-08-1999
EP 265116 A	27-04-1988	IT 1198449 B	21-12-1988
		AT 163942 T	15-03-1998
		AU 610087 B	16-05-1991
		AU 7960087 A	21-04-1988
		CA 1317287 A	04-05-1993
		CN 1025035 B	15-06-1994
		DE 3752176 D	16-04-1998
		DE 3752176 T	29-10-1998
		DK 536087 A	14-04-1988
		ES 2115583 T	01-07-1998
		FI 874504 A, B,	14-04-1988
		HU 45734 A, B	29-08-1988
		IL 84032 A	20-11-1997
		IN 170958 A	20-06-1992
		IN 170801 A	23-05-1992
		JP 2648308 B	27-08-1997
		JP 63105003 A	10-05-1988
		KR 9202702 B	31-03-1992
		NO 175374 B	27-06-1994
		NZ 221994 A	26-07-1990
		PH 26025 A	29-01-1992
		PT 85908 A, B	01-11-1987
		US 4957744 A	18-09-1990
		ZA 8707559 A	13-04-1988
JP 09176204 A	08-07-1997	NONE	

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW